

8
Dmt
5-1302

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Katsuhiko Mikoshiba
Title: RNA-BINDING PROTEIN
Appl. No.: Unassigned
Filing Date: March 30, 2001
Examiner: Unassigned
Art Unit: Unassigned



CLAIM FOR CONVENTION PRIORITY

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application filed in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed.

In support of this claim, filed herewith is a certified copy of said original foreign application:

- Japanese Patent Application No. 2000-299812 filed September 29, 2000.

Respectfully submitted,

Date March 30, 2001

By

A handwritten signature in black ink, appearing to read "S. A. Bent". The signature is written over a horizontal line.

FOLEY & LARDNER
Washington Harbour
3000 K Street, N.W., Suite 500
Washington, D.C. 20007-5109
Telephone: (202) 672-5404
Facsimile: (202) 672-5399

Stephen A. Bent
Attorney for Applicant
Registration No. 29,768

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2000年 9月29日

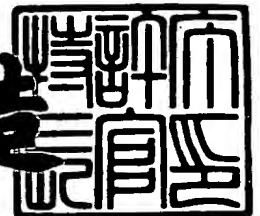
出 願 番 号
Application Number: 特願2000-299812

出 願 人
Applicant(s): 理化学研究所
御子柴 克彦

2001年 2月23日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3009461



【書類名】 特許願

【整理番号】 RJH12-065N

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【提出日】 平成12年 9月29日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 R N A 結合タンパク質

【請求項の数】 14

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都三鷹市井の頭 2 - 1 9 - 2 5

 【氏名】 御子柴 克彦

【特許出願人】

 【識別番号】 000006792

 【氏名又は名称】 理化学研究所

【特許出願人】

 【識別番号】 392017978

 【氏名又は名称】 御子柴 克彦

【代理人】

 【識別番号】 100091096

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

 【識別番号】 100096183

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 015244

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9503608

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 RNA結合タンパク質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質。

(a)配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b)配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつRNAとの結合活性を有するタンパク質

【請求項 2】 以下の(c)又は(d)の組換えタンパク質。

(c)配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(d)配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつRNAとの結合活性を有するタンパク質

【請求項 3】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

(a)配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b)配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつRNAとの結合活性を有するタンパク質

【請求項 4】 以下の(c)又は(d)のタンパク質をコードする遺伝子。

(c)配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(d)配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつRNAとの結合活性を有するタンパク質

【請求項 5】 以下の(e)又は(f)のDNAを含む遺伝子。

(e)配列番号 1 に示される塩基配列を含むDNA

(f)配列番号 1 に示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつRNA結合活性を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項 6】 以下の(g)又は(h)のDNAからなる遺伝子。

(g)配列番号 3 に示される塩基配列のうち第154番目～第1836番目の塩基配列を

含むDNA

(h) 配列番号 3 に示される塩基配列のうち第154番目～第1836番目の塩基配列を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつRNA結合活性を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項 7】 請求項 3 ～ 6 のいずれかに記載の遺伝子を含有する組換えベクター。

【請求項 8】 請求項 7 記載の組換えベクターを含む形質転換体。

【請求項 9】 請求項 8 記載の形質転換体を培養し、得られる培養物からRNA結合タンパク質を採取することを特徴とするRNA結合タンパク質の製造方法。

【請求項 1 0】 請求項 1 又は 2 記載のタンパク質に対する抗体。

【請求項 1 1】 請求項 1 又は 2 記載のタンパク質を有効成分として含有する神経細胞機能調節用医薬組成物。

【請求項 1 2】 請求項 1 又は 2 記載のタンパク質を有効成分として含有する神経系疾患治療剤。

【請求項 1 3】 請求項 10 記載の抗体を含む、シナプトタグミン結合性及びRNA結合性タンパク質の検出用試薬。

【請求項 1 4】 請求項 1 若しくは 2 記載のタンパク質及び/又は請求項 10 記載の抗体を含む、シナプトタグミンの検出用試薬。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、シナプトタグミン結合性のタンパク質であって細胞質に存在するRNAと結合するタンパク質、及び該タンパク質をコードする遺伝子に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

哺乳動物のシナプス前末端からの神経伝達物質の放出は、シナプス小胞と軸索末端の形質膜との融合が生ずるところから始まることが知られている。シナプス小胞タンパク質であるVAMP1又は2、並びに2種類のシナプス前膜タンパク質（シンタキシン(syntaxin)1及びSNAP-25）は神経伝達物質の放出に不可欠であり（Sc

heller, R. H. (1995) *Neuron* 14, 893-897; Sudhof, T. C. (1995) *Nature* 375, 645-653; Augustine, G. J. et al. (1996) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36, 659-701)、これらのタンパク質間における複合体の形成が、シナプス小胞が膜と融合するための最初の分子的过程となる。

【 0 0 0 3 】

ところで、シナプトタグミン(Syt)は、神経伝達物質の輸送に重要な役割を果たすタンパク質であり、ラット及びマウスにおいて少なくとも12種類のイソフォーム(Syt-I~Syt-XII)からなるファミリーを形成していることが知られている(Schiavo, G. et al. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248, 1-8; Li, C. et al. (1995) *Nature* 375, 594-599)。このうちSyt-Iは、シナプス小胞の膜上に1回膜貫通タンパク質として存在し、プロテインキナーゼCのC2調節領域(Sudhof, T. and Rizo, J. (1996) *Neuron* 17, 379-388; Schiavo, G. et al., (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248, 1-8)と相同性を有するドメイン(C2A及びC2Bと呼ばれる2つのドメイン)から構成される。Syt-Iは神経伝達に参与するタンパク質の1つであり、その機構は、シナプス小胞上に存在するシナプトタグミンのC2Bドメインが細胞膜に融合してシナプス小胞膜を開口し、シナプス小胞中の神経伝達物質が輸送されるというものである。

【 0 0 0 4 】

本発明者は、イノシトール1,3,4,5-テトラキスホスフェート(inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate; IP4)がSyt-I, II, IV, VI~IX及びXIのC2Bドメインに結合することを見出した(Fukuda, M. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 29026-29211; Ibata, K. et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 12267-12273)。そして、Sytにより調節されるイノシトール高ポリリン酸シリーズ(IHPS: IP4及びIP6)が、小胞の輸送の調節について重要な役割を果たすことを示した(Fukuda, M. and Mikoshiba, K. (1997) *BioEssays* 19, 593-603)。例えば、SytのC2Bドメインにイノシトール高ポリリン酸が結合すると、シナプス小胞がシナプス前膜と融合するステップが阻害され(Fukuda, M. et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10703-10707; Mochida, S. et al. (1997) *Neuroscience* 77, 937-943; Ohara-Imaizumi, M. et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10708-

10712)、IP4の存在によりC2Bドメインと膜は引き離される。その結果、神経伝達が阻害される。

このように、シナプス小胞とシナプス前膜との間には種々の物質が関与していると考えられる。

【 0 0 0 5 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、シナプトタグミン結合性の、細胞質に存在するRNA結合タンパク質を提供することを目的とする。

【 0 0 0 6 】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、シナプトタグミンに結合することができるタンパク質について解析を行った結果、シナプトタグミンに結合し、かつ、細胞質中のRNAにも結合することができるRNA結合性タンパク質を単離することに成功し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 0 7 】

すなわち、本発明は、以下の通りである。

(1) 以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質。

(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつRNAとの結合活性を有するタンパク質

【 0 0 0 8 】

(2) 以下の(c)又は(d)の組換えタンパク質。

(c)配列番号4に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(d)配列番号4に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつRNAとの結合活性を有するタンパク質

【 0 0 0 9 】

(3) 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

(a) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ RNA との結合活性を有するタンパク質

【 0 0 1 0 】

(4) 以下の (c) 又は (d) のタンパク質をコードする遺伝子。

(c) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(d) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ RNA との結合活性を有するタンパク質

【 0 0 1 1 】

(5) 以下の (e) 又は (f) の DNA を含む遺伝子。

(e) 配列番号 1 に示される塩基配列を含む DNA

(f) 配列番号 1 に示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ RNA 結合活性を有するタンパク質をコードする DNA

【 0 0 1 2 】

(6) 以下の (g) 又は (h) の DNA からなる遺伝子。

(g) 配列番号 3 に示される塩基配列のうち第 154 番目～第 1836 番目の塩基配列を含む DNA

(h) 配列番号 3 に示される塩基配列のうち第 154 番目～第 1836 番目の塩基配列を含む DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ RNA 結合活性を有するタンパク質をコードする DNA

【 0 0 1 3 】

(7) 前記遺伝子を含有する組換えベクター。

(8) 前記組換えベクターを含む形質転換体。

(9) 前記形質転換体を培養し、得られる培養物から RNA 結合タンパク質を採取することを特徴とする RNA 結合タンパク質の製造方法。

(10) 前記タンパク質に対する抗体。

【 0 0 1 4 】

- (11) 前記タンパク質を有効成分として含有する神経細胞機能調節用医薬組成物。
- (12) 前記タンパク質を有効成分として含有する神経系疾患治療剤。
- (13) 前記タンパク質に対する抗体を含む、シナプトタグミン結合性及びRNA結合性タンパク質の検出用試薬。
- (14) 前記タンパク質及び/又は前記タンパク質に対する抗体を含む、シナプトタグミンの検出用試薬。

以下、本発明を詳細に説明する。

【 0 0 1 5 】

【発明の実施の形態】

本発明のタンパク質は、シナプトタグミン結合性及び細胞質RNA結合性のタンパク質であり、「SYNCRIP」(Synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein)と称するものである(分子量66kDa)。SYNCRIPは、その一部の領域が細胞質中に存在するmRNA(特にポリA領域)と結合し、他の一部の領域がシナプス小胞のC2Bドメインと結合する。そして、シナプス小胞は神経細胞体で作られた後、シナプス前末端に輸送されるため、SYNCRIPはRNAのいわゆる「運搬体」として機能するものである。

【 0 0 1 6 】

SytのC2Bドメインにイノシトール高ポリリン酸が結合すると、シナプス小胞とシナプス前膜との融合ステップが阻害される。本発明者は、この阻害についてSytのC2ABドメインと直接相互作用する分子を解析した。その結果、シナプトタグミンと結合する、細胞質RNA結合性タンパク質を見出した。

1. SYNCRIPをコードする遺伝子の単離

本発明の遺伝子は、マウス、ラットなどの小脳から抽出したmRNAを用いて作製されたcDNAライブラリーを、小脳から精製されたSYNCRIPの部分アミノ酸配列をもとにして合成したDNAプローブを用いてスクリーニングすることにより単離することができる。

【 0 0 1 7 】

mRNAの調製は、通常行われる手法により行うことができる。例えば、上記組織

又は細胞を、グアニジン試薬、フェノール試薬等で処理して全RNAを得た後、オリゴdT-セルロースやセファロース2Bを担体とするポリU-セファロース等を用いたアフィニティーカラム法により、あるいはバッチ法によりポリ(A+)RNA(mRNA)を得る。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等によりポリ(A+)RNAを分画してもよい。

【0018】

このようにして得られたmRNAを鋳型として、オリゴdTプライマー及び逆転写酵素を用いて一本鎖cDNAを合成した後、該一本鎖cDNAから二本鎖cDNAを合成する。このようにして得られた二本鎖cDNAを適当なクローニングベクターに組み込んで組換えベクターを作製する。得られる組換えベクターを用いて大腸菌等を形質転換し、テトラサイクリン耐性、アンピシリン耐性を指標として形質転換体を選択することにより、cDNAのライブラリーを得ることができる。

【0019】

ここで、大腸菌の形質転換は、公知の方法、例えば塩化カルシウム、塩化マグネシウム又は塩化ルビジウムを共存させて調製したコンピテント細胞に、組換えベクターを加える方法(Hanahan,D. (1983) J. Mol. Biol. 166, 557-580)等に基づいて行うことができる。なお、ベクターとしてプラスミドを用いる場合はテトラサイクリン、アンピシリン等の薬剤耐性遺伝子を含有することが必要である。また、プラスミド以外のクローニングベクター、例えばλファージ等を用いることもできる。

【0020】

上記のようにして得られる形質転換体から目的のDNAを有する株を選択するスクリーニング方法としては、例えば、マウス小脳から精製したSYNCRIPのアミノ酸配列に対応するセンスプライマー及びアンチセンスプライマーを合成し、これを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行う方法が挙げられる。マウス小脳からSYNCRIPを精製するには、マウス小脳を適当な緩衝液に懸濁し、遠心により細胞残骸を除去した後、例えばイオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動等の周知の精製手段を単独で又は適宜組み合わせて行うことができる。

【0021】

ここで用いられる鋳型DNAとしては、前記mRNAから逆転写反応により合成されたcDNAが挙げられる。また、プライマーは、増幅したときのDNA断片の予想サイズ、あるいは縮重コドンの組み合わせなどを適宜検討しながら、SYNCRIPのアミノ酸配列情報に基づいて設計することができる。例えばセンス鎖についてはVTEGLT（配列番号6）に基づいて合成した5'-GTNACNGA(AG)GGN(TC)TNAC-3'（配列番号8）を、アンチセンス鎖についてはYHQPDDK（配列番号7）に基づいて合成した5'-(TC)TT(AG)TC(AG)TCNGG(TC)TG(AG)TG(AG)TA-3'（配列番号9）を用いることができる。但し、本発明においてはこれらのプライマーに限定されるものではない。

【0022】

このようにして得られたDNA増幅断片を、 ^{32}P 、 ^{35}S 又はビオチン等で標識してプローブとし、これを形質転換体のDNAを変性固定したニトロセルロースフィルターとハイブリダイズさせ、得られたポジティブ株を検索することによりスクリーニングすることができる。

【0023】

(2) 塩基配列の決定

得られたクローンについて塩基配列の決定を行う。塩基配列の決定はマキサム-ギルバートの化学修飾法、又はM13ファージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法等の公知手法により行うことができるが、通常は自動塩基配列決定機（例えばPERKIN-ELMER社製373A DNAシーケンサー、TAKARA社製BcaBESTジデオキシシーケンシングキット等）を用いて配列決定が行われる。

【0024】

配列番号3に本発明の遺伝子（全長cDNA）の塩基配列を、配列番号4に本発明のタンパク質のアミノ酸配列を例示する。配列番号3に示す塩基配列において、オープンリーディングフレームは第154番目から第1836番目までの塩基配列により形成されており、配列番号4に示すアミノ酸配列は当該塩基配列によってコードされる。従って、配列番号3に示す塩基配列を有する遺伝子のほか、上記オープンリーディングフレーム領域の遺伝子も本発明の遺伝子に含まれる。

【 0 0 2 5 】

ここで、上記アミノ酸配列（配列番号4）からなるタンパク質がRNA結合活性、特にmRNAのポリA配列との結合活性を有する限り、当該アミノ酸配列において複数のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてもよい。例えば、配列番号4に示されるアミノ酸配列の1又は数個、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失してもよく、配列番号4に示されるアミノ酸配列に1又は数個、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号4に示されるアミノ酸配列の1又は数個、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよい。

なお、本発明において、RNA結合活性とは、SYNCRIPの一部の領域が細胞質中に存在するRNA（特にmRNAのポリA領域）と結合する活性を意味する。

【 0 0 2 6 】

また、配列番号4に示すアミノ酸配列を有するタンパク質の末端欠失型であって上記RNA結合活性を有するものも、本発明のタンパク質に含まれる。例えば、配列番号4に示すアミノ酸配列のうち第401番目～第561番目のアミノ酸を欠失したもの（C末端側切断型）はRNA結合活性を失うことから、当該第401番目～第561番目のアミノ酸配列（配列番号2）を有するタンパク質（すなわち配列番号4に示すアミノ酸配列のうち第1番目～第400番目のアミノ酸を欠失させたもの）も本発明のタンパク質に含まれる。さらに、上記末端欠失型タンパク質において1又は数個のアミノ酸配列に前記変異が導入されたものであってRNA結合活性を有するタンパク質も、本発明のタンパク質に含まれる。

【 0 0 2 7 】

従って、上記変異が導入されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子、又は末端欠失型タンパク質若しくはその変異型をコードする遺伝子も、該タンパク質がRNAとの結合活性を有する限り本発明の遺伝子に含まれる。

【 0 0 2 8 】

また、本発明のタンパク質（SYNCRIPともいう）は、シナプトタグミンにも結合することができるタンパク質である。本発明のSYNCRIPは、上記シナプトタグ

ミンとの結合能を有する限りシナプトタグミンI～XIまでのいずれのイソフォームでもよいが、シナプトタグミンI及びIIが好ましい。

【 0 0 2 9 】

さらに、上記遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるDNAも本発明の遺伝子に含まれる。ストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が600～900mMであり、温度が60～68℃、好ましくは65℃での条件をいう。

【 0 0 3 0 】

なお、遺伝子に変異を導入するには、Kunkel法又は Gapped duplex法等の公知手法又はこれに準ずる方法により行うことができる。例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えばMutant-K(TAKARA社製）やMutant-G(TAKARA社製））などを用いて、あるいは、TAKARA社のLA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを用いて変異が導入される。

【 0 0 3 1 】

一旦本発明の遺伝子の塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、又は本遺伝子のcDNAを鋳型としたPCRによって、あるいは該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明の遺伝子を得ることができる。

【 0 0 3 2 】

2. 組換えベクター及び形質転換体の作製

(1) 組換えベクターの作製

本発明の組換えベクターは、適当なベクターに本発明の遺伝子を連結(挿入)することにより得ることができる。本発明の遺伝子を挿入するためのベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミド DNA、ファージ DNA等が挙げられる。

【 0 0 3 3 】

プラスミド DNAとしては、大腸菌由来のプラスミド（例えばpRSET、pBR322、pBR325、pUC118、pUC119、pUC18、pUC19等）、枯草菌由来のプラスミド（例えばpUB110、pTP5等）、酵母由来のプラスミド（例えばYEp13、YEp24、YCp50等）などが

挙げられ、ファージDNAとしてはλファージ (Charon4A、Charon21A、EMBL3、EMBL4、λgt10、λgt11、λZAP等) が挙げられる。さらに、レトロウイルス又はワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクターを用いることもできる。

【 0 0 3 4 】

ベクターに本発明の遺伝子を挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクター DNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。

【 0 0 3 5 】

本発明の遺伝子は、その遺伝子の機能が発揮されるようにベクターに組み込まれることが必要である。そこで、本発明のベクターには、プロモーター、本発明の遺伝子のほか、所望によりエンハンサーなどのシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、リボソーム結合配列 (SD配列) などを含有するものを連結することができる。なお、選択マーカーとしては、例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

【 0 0 3 6 】

(2) 形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、本発明の組換えベクターを、目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。ここで、宿主としては、本発明のDNAを発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、エッシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 等のエッシェリヒア属、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のバチルス属、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) 等のシュードモナス属、リゾビウム・メリロティ (*Rhizobium meliloti*) 等のリゾビウム属に属する細菌が挙げられる。また、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) 等の酵母、さらにCOS細胞、CHO細胞等の動物細胞が挙げられる。あるいはSf9、Sf21等の昆虫細胞を用いることもできる。

【 0 0 3 7 】

大腸菌等の細菌を宿主とする場合は、本発明の組換えベクターが該細菌中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明の遺伝子、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【 0 0 3 8 】

大腸菌としては、例えばエッシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12、DH1などが挙げられ、枯草菌としては、例えばバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) などが挙げられる。プロモーターとしては、大腸菌等の宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えば trp プロモーター、lac プロモーター、 P_L プロモーター、 P_R プロモーターなどの、大腸菌やファージに由来するプロモーターが用いられる。tac プロモーターなどのように、人為的に設計改変されたプロモーターを用いてもよい。細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌に DNA を導入する方法であれば特に限定されるものではない。例えばカルシウムイオンを用いる方法 (Cohen, S.N. et al. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci., U SA 69, 2110-2114)、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

【 0 0 3 9 】

酵母を宿主とする場合は、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ピヒア・パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。この場合、プロモーターとしては酵母中で発現できるものであれば特に限定されず、例えば gal1 プロモーター、gal10 プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、 $MF\alpha 1$ プロモーター、PH05 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、AOX1 プロモーター等が挙げられる。酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母に DNA を導入する方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法 (Becker, D.M. et al. (1990) Methods. Enzymol., 194, 182-187)、スフェロプラスト法 (Hinnen, A. et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 75, 1929-1933)、酢酸リチウム法 (Itoh, H. (1983) J. Bacteriol. 153, 163-168) 等が挙げられる。

【 0 0 4 0 】

動物細胞を宿主とする場合は、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）、マウスL細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる。プロモーターとしてSR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター等が用いられ、また、ヒトサイトメガロウイルスの初期遺伝子プロモーター等を用いてもよい。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

【0041】

昆虫細胞を宿主とする場合は、Sf9細胞、Sf21細胞などが用いられる。昆虫細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法などが用いられる。

【0042】

4. SYNCRIPの生産

本発明のタンパク質は、前記形質転換体を培養し、その培養物から採取することにより得ることができる。「培養物」とは、培養上清のほか、培養細胞若しくは培養菌体又は細胞若しくは菌体の破砕物のいずれをも意味するものである。「本発明の形質転換体を培養する方法は、宿主の培養に適用される通常の方法に従って行われる。

【0043】

大腸菌や酵母菌等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物のほか、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー等が用いられる。無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化

ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

【0044】

培養は、通常、振盪培養又は通気攪拌培養などの好氣的条件下、37℃で6～24時間行う。培養期間中、pHは7.0～7.5に保持する。pHの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。培養中は必要に応じてアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0045】

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、Lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸(IAA)等を培地に添加してもよい。

【0046】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地、DMEM培地又はこれらの培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常、5%CO₂存在下、37℃で1～30日行う。培養中は必要に応じてカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0047】

培養後、SYNCRIPが菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破碎することによりSYNCRIPタンパク質を抽出する。また、本発明のSYNCRIPタンパク質が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせて用いることにより、前記培養物中から本発明のSYNCRIPタンパク質を単離精製することができる。

【 0 0 4 8 】

5. SYNCRIPに対する抗体

(1) 抗原の調製

本発明においては、前記の通り単離精製したSYNCRIP又はその一部の断片を抗原として用いて、SYNCRIPに対する抗体を調製することができる。

(2) 本発明のSYNCRIPに対するポリクローナル抗体の作製

前記のようにして調製した抗原を用いて動物を免疫する。抗原の動物 1 匹当たりの投与量は、ウサギの場合、例えばアジュバントを用いて100～500 μ gである。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)、水酸化アルミニウムアジュバント等が挙げられる。

【 0 0 4 9 】

免疫は、哺乳動物（例えばラット、マウス、ウサギなど）に投与することにより行われる。投与部位は静脈内、皮下又は腹腔内である。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは2～3週間間隔で、1～10回、好ましくは2～3回免疫を行う。そして、最終の免疫日から6～60日後に抗体価を測定し、最大の抗体価を示した日に採血し、抗血清を得る。抗体価の測定は、酵素免疫測定法(ELISA ; enzyme-linked immunosorbent assay)、放射性免疫測定法(RIA ; radioimmuno assay)等により行うことができる。

【 0 0 5 0 】

抗血清から抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。

【 0 0 5 1 】

(3) SYNCRIPに対するモノクローナル抗体の作製

(3-1) 免疫及び抗体産生細胞の採取

上記のようにして調製された抗原タンパク質を用いて動物を免疫する。必要であれば、免疫を効果的に行うため、前記と同様アジュバント（市販のフロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント等）を混合してもよい。

【 0 0 5 2 】

免疫は、哺乳動物（例えばラット、マウス、ウサギなど）に投与することにより行われる。抗原の1回の投与量は、マウスの場合1匹当たり50 μ gである。投与部位は、主として静脈内、皮下、腹腔内である。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは2～3週間間隔で、最低2～3回行う。そして、最終免疫後、抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞等が挙げられるが、脾臓細胞が好ましい。

【0053】

(3-2) 細胞融合

ハイブリドーマを得るため、抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行う。抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞として、マウスなどの動物由来の細胞であって一般に入手可能な株化細胞を使用することができる。使用する細胞株として、薬剤選択性を有し、未融合の状態ではHAT選択培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む）で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが好ましい。例えば、ミエローマ細胞の具体例としてはP3X63-Ag.8.U1 (P3U1)、P3/NSI/1-Ag4-1、Sp2/0-Ag14などのマウスミエローマ細胞株が挙げられる。

【0054】

次に、上記ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを細胞融合させる。細胞融合は、血清を含まないDMEM、RPMI-1640培地などの動物細胞培養用培地中に、抗体産生細胞とミエローマ細胞とを15:1～25:1の割合で混合し、ポリエチレングリコール等の細胞融合促進剤存在のもとで、あるいは電気パルス処理（例えばエレクトロポレーション）により融合反応を行う。

【0055】

(3-3) ハイブリドーマの選別及びクローニング

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。例えば、ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培地を用いて培養し、生育する細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

【0056】

次に、増殖したハイブリドーマの培養上清中に、目的とする抗体が存在するか

否かをスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは、通常の方法に従えばよく、特に限定されるものではない。例えば、ハイブリドーマとして生育したウェルに含まれる培養上清の一部を採集し、酵素免疫測定法 (ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay)、RIA (radioimmuno assay)等によってスクリーニングすることができる。融合細胞のクローニングは、限界希釈法等により行い、最終的に単クローン抗体産生細胞であるハイブリドーマを樹立する。

【0057】

(3-4) モノクローナル抗体の採取

樹立したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法として、通常の細胞培養法等を採用することができる。細胞培養法においては、ハイブリドーマを10%牛胎児血清含有 RPMI-1640培地又はMEM 培地等の動物細胞培養培地中、通常の培養条件 (例えば37℃, 5% CO₂濃度) で3~10日間培養し、その培養上清から抗体を取得する。

【0058】

上記抗体の採取方法において、抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸分画法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜に選択して、又はこれらの方法を組み合わせることにより精製することができる。

【0059】

6. 神経細胞機能調節用医薬組成物

本発明のタンパク質はRNAにもシナプトタグミンにも結合することができ、しかもシナプトタグミンは神経細胞の細胞体から神経末端まで移動するため、神経伝達物質をコードするRNAを神経末端に運搬する機能を果たす。従って、本発明の遺伝子及びタンパク質は、神経伝達物質を神経末端で発現させるための調節剤、すなわち神経細胞機能調節用医薬組成物として使用することができ、神経細胞の賦活剤、神経系疾患の遺伝子治療剤として有用である。

本発明の治療剤又は遺伝子治療剤は、経口又は非経口的に全身又は局所投与することができる。

【0060】

本発明のタンパク質又は遺伝子を神経系疾患の治療剤又は遺伝子治療剤として使用する場合は、使用する対象を特に限定するものではない。例えば、神経伝達が機能しない又は機能が低下したときに発症するパーキンソン病、アルツハイマー病などの神経系疾患について治療又は予防を特異目的として用いることができる。これらの疾患は、単独であっても、併発したものであっても、上記以外の他の疾病を併発したものであってもよく、いずれも本発明のタンパク質又は遺伝子の使用の対象とすることができる。

【 0 0 6 1 】

本発明の調節剤を経口投与する場合は、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、丸剤、トローチ剤、内用水剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤等のいずれのものであってもよく、使用する際に再溶解させる乾燥生成物にしてもよい。また、本発明の調節剤を非経口投与する場合は、静脈内注射（点滴を含む）、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、坐剤などの製剤形態を選択することができ、注射用製剤の場合は単位投与量アンプル又は多投与量容器の状態で提供される。

【 0 0 6 2 】

これらの各種製剤は、製剤上通常用いられる賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、潤滑剤、界面活性剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤、等張化剤等などを適宜選択し、常法により製造することができる。

【 0 0 6 3 】

上記各種製剤は、医薬的に許容される担体又は添加物を共に含むものであってもよい。このような担体及び添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトースなどが挙げられる。使用される添加物は、本発明の剤型に応じて上記の中から適宜又は組み合わせて選択される

【 0 0 6 4 】

本発明の治療剤の投与量は、投与対象の年齢、投与経路、投与回数により異なり、広範囲に変えることができる。この場合、本発明のタンパク質の有効量と適切な希釈剤及び薬理学的に使用し得る担体との組合せとして投与される有効量は、一回につき体重1kgあたり0.01mg～1000 mgの範囲の投与量を選ぶことができ、1日1回から数回に分けて1日以上投与される。

【 0 0 6 5 】

本発明の遺伝子を神経系疾患に対する遺伝子治療剤として使用する場合は、本発明の遺伝子を注射により直接投与する方法のほか、該遺伝子が組込まれたベクターを投与する方法が挙げられる。上記ベクターとしては、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター等が挙げられ、これらのウイルスベクターを用いることにより効率よく投与することができる。また、本発明の遺伝子をリポソームなどのリン脂質小胞に導入し、そのリポソームを投与する方法を採用してもよい。すなわち、リポソームは、生物的に分解可能な素材を含む閉鎖小胞であるため、リポソームと本発明の遺伝子とを混合することにより、リポソーム内部の水層や脂質二分子層に本発明の遺伝子を保持させる（リポソーム-遺伝子複合体）。次に、該複合体を細胞とともに培養すると複合体中の遺伝子が細胞内に取り込まれる（リポフェクション法）。そして、得られる細胞を以下の投与方法で投与すればよい。

【 0 0 6 6 】

本発明の遺伝子治療剤の投与形態としては、通常の静脈内、動脈内等の全身投与のほか、中枢神経系組織（脳、脊髄）に局所投与を行うことができる。さらに、カテーテル技術、外科的手術等と組み合わせた投与形態を採用することもできる。

本発明の遺伝子治療剤の投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型によって異なるが、通常は、本発明の遺伝子の重量にすると成人1日あたり0.1～100mg/bodyの範囲が適当である。

【 0 0 6 7 】

7. SYNCRIP検出用試薬

本発明の抗体は、SYNCRIP又はその部分断片と反応するため、SYNCRIPの検出用試薬として使用することができる。SYNCRIPの検出方法は特に限定されるものではなく、例えばウエスタンブロッティング法などを採用することができる。例えば、被検対象（細胞成分又はその各分画等）を電気泳動等により分画し、次に、予め標識（放射標識、蛍光染色等）された本発明の抗体と反応させてシグナルを検出する。

【 0 0 6 8 】

SYNCRIPの検出に使用する抗体は、SYNCRIPの全長アミノ酸配列を有するタンパク質に対する抗体でもよく、SYNCRIPの部分アミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体でもよい。

【 0 0 6 9 】

8. シナプトタグミン検出用試薬

また、本発明のSYNCRIP又はその部分断片（例えば末端切断型）は、シナプトタグミンと結合することができるため、シナプトタグミン検出用試薬として使用することができる。ここで、シナプトタグミンにはC2A及びC2Bのドメインが含まれているが、SYNCRIPはC2Bと結合することができる。従って、本発明では、これらのドメインのうちC2Bドメインを検出の対象とすることができる。

【 0 0 7 0 】

シナプトタグミンの検出は、被検対象（細胞溶解物）とSYNCRIP又はその部分断片とを反応させ、反応産物をウエスタンブロッティングを行うことにより達成される。例えば、シナプトタグミンを含む細胞溶解物又はその細胞分画を電気泳動等で分画し、これに予め標識（放射標識又は蛍光標識）されたSYNCRIP又はその部分断片を反応させてシグナルを検出する。あるいは、シナプトタグミンとGST（グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）との融合タンパク質を公知方法により作製し、これにSYNCRIPを反応させる。反応産物をグルタチオン-Sepharoseで回収し、ウエスタンブロッティングを行い、シグナルを検出する。

【 0 0 7 1 】

なお、ウエスタンブロッティングにおいては、SYNCRIP又はその部分断片に対する抗体（標識抗体）を使用し、当該抗体から発せられるシグナルを測定する。従って、当該抗体は、シナプトタグミンを検出するための試薬として使用することもできる。

【 0 0 7 2 】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

【実施例1】 SYNCRIPの単離及びSYNCRIP遺伝子のクローニング

(1) マウス脳からのSYNCRIPの部分アミノ酸配列の決定

SYNCRIPの部分精製は、公知方法(Mizutani, A. et al. (1997) Biochem. Biophys. Res. Commun. 240, 128-131)に改良を加えて行った。

すなわち、マウス（DDY系、8週齢）の全脳(50g湿重量)を以下の組成を含む溶液250ml中に入れ、グラス-Teflonホモゲナイザー(930rpm, 10ストローク)を用いて懸濁した。

【 0 0 7 3 】

10mM HEPES-NaOH (pH7.4)
140mM NaCl
2mM EDTA
1mM β -メルカプトエタノール
0.2mM フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)
10 μ M ペプスタチン A

【 0 0 7 4 】

低速遠心（1,000×g、10分）により細胞塊及び核の粗画分を除去した後、Triton X-100を加えて最終濃度1%(w/v)の上清画分（S1）とし、氷上で30分放置した。続いて上清画分（S1）を16,000×gで30分超遠心して可溶性画分を得、精製したGST-Syt II C2ABタンパク質(5mg)とともに4℃で4時間インキュベートした。この混合物に1ml（50%スラリー）のグルタチオン-セファロースを加え、4℃で1時間インキュベートした。洗浄緩衝液(10mM HEPES-NaOH (pH7.4)、140mM NaCl、2mM EDTA及び1mM β -メルカプトエタノール10mM)を用いて十分洗浄し、洗浄緩衝液

中、100 μ M IP6を用いて結合タンパク質を溶出した。溶出されたタンパク質は、MonoQ イオン交換クロマトグラフィによりさらに分離操作を行った。

【0075】

その結果、0.2MのNaCl、pH8.0付近で66kDaのタンパク質が溶出された。66kDaタンパク質に富む画分を10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、クマシーブリリアントブルーRで染色した。66kDaのタンパク質バンドをゲルから切り出し、公知方法 (Rosenfeld, J. et al. (1992) Anal. Biochem. 203, 173-179) によりリシルエンドペプチダーゼ (和光純薬社) で処理した。得られたポリペプチドを、SMARTシステム (Amersham Pharmacia Biotech社) 上に接続したC-18逆層クロマトグラフィーカラム (MRPC C2/C18 SC 2.1/10, Amersham Pharmacia Biotech社) で分離した。各ペプチドの配列は、Perkin Elmer Biosystems 492タンパク質シーケンサーで決定した。

【0076】

(2) 66kDaタンパク質SYNCRIPのcDNAクローニング

部分消化したペプチド1 (VTEGLTDVILYHQPD DK:配列番号5) に対応する縮重プライマーを合成した。センスプライマーはVTEGLT (配列番号6) に基づいて合成し、アンチセンスプライマーはYHQPD DK (配列番号7) に基づいて合成した。

センスプライマー: 5'-GTNACNGA(AG)GGN(TC)TNAC-3' (配列番号8)

アンチセンスプライマー: 5'-(TC)TT(AG)TC(AG)TCNGG(TC)TG(AG)TG(AG)TA-3' (配列番号9)

【0077】

ランダムプライマーを用いてマウス小脳由来第1鎖cDNAをPCR (宝酒造社PCRキット: (94°C 30秒、55°C 1分及び72°C 1分)×35サイクル) により増幅した。51bpのPCR産物をpT7Blue (Novagen社) にクローニングし、配列を確認した。

[α -³²P] dCTP (Amersham Pharmacia Biotech社) でラベルした51bpの上記プローブを用いて、 λ gt11中のマウス小脳由来cDNAライブラリーから約 5.0×10^5 プラークをスクリーニングした。

【0078】

66kDaのタンパク質の部分アミノ酸配列を決定し、得られたアミノ酸配列に基

づいてcDNAを単離した結果、部分的にオーバーラップする各種クローンが得られた(図1A)。このうちクローン1a(図1A)の5'又は3'末端断片(約200bp)をハイブリダイゼーションプローブとして用いて、 λ gt cDNAライブラリーをスクリーニングした。その結果、全長のSYNCRIPをコードするcDNAを得た。クローニングされたcDNAをpBluescriptにサブクローニングし、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPを用いたジデオキシ鎖ターミネーション法(BcaBEST ジデオキシシークエンシングキット:TAKARA社)により両方向から全長の配列決定を行った。

【0079】

配列番号3に全長SYNCRIPをコードする遺伝子(cDNA)の塩基配列を、配列番号4にSYNCRIPのアミノ酸配列(オープンリーディングフレーム)を示す。

クローニングされたcDNAの推定アミノ酸配列のホモロジー解析を行った結果、ヒトヘテロ核リボ核タンパク質R(hnRNP R)と高いホモロジーを有していた(図2)。なお、hnRNP Rは、Hassefeldらによって定義された分子量82kDaのタンパク質である(Hassefeld, W. et al., (1998) Nucleic Acids Res. 26, 439-445)。hnRNP Rは核質内に局在することが知られている物質であり、後述の通り本発明のSYNCRIPとは機能的に全く異なるものである。

【0080】

〔実施例2〕 SYNCRIPの発現

(1) SYNCRIPの局在

本実施例では、SYNCRIPの細胞内における発現領域を確認するとともに、実施例1において相同性を比較したhnRNP Rと本発明のSYNCRIPとが機能的に異なる物質であることを示すため、SYNCRIP及びhnRNP Rの両者をCOS-7細胞で発現させ、それぞれのタンパク質の挙動を調べた。方法は以下の通りである。

【0081】

SYNCRIPをCOS-7細胞において一過性に発現させるため、SYNCRIPの全長をコードするcDNAの5'末端にEcoRI、3'末端にXhoIの制限酵素部位をPCR法を用いて導入し、得られたDNA断片をプラスミドpCDNA3 (Invitrogen社)にサブクローニングした。遺伝子構築物を、Lipofectamine試薬(Life Technologies社)を用いて使用説明書に従ってCOS-7細胞にトランスフェクトした。

【 0 0 8 2 】

また、SYNCRIPに対する2種類のポリクローナル抗体を作製した。1つはSYNCRIPのN末端領域に対するものであり（図2、枠囲み部分）、抗SYNCRIP-N抗体と称する。もう1つは、SYNCRIPとhnRNP Rとの間で完全に相同性を有する領域に対するものであり（図2、二重下線部分）、抗SYNCRIP-Pep抗体と称する。

【 0 0 8 3 】

なお、ウエスタンブロッティング用の抗体は、以下の通り調製した。

① 抗SYNCRIP-N抗体

(His)₆のタグを付した、SYNCRIPのN-末端領域（アミノ酸領域1-170）を含む組換えタンパク質を大腸菌で発現させ、ProBond樹脂(Invitrogen)を用いて部分精製した。続いてMonoQカラムクロマトグラフィーによりタンパク質を十分に精製した。得られた精製タンパク質300 μ gを、フロイント完全アジュバントとともに日本白ウサギに投与して免疫した（皮下注射、14日間隔）。一方、抗原タンパク質に対応する領域を保有するGST融合タンパク質で共有結合させたアフィニティーカラムを作製した。ウサギから採血して血清を得た後、該血清を上記アフィニティーカラムにかけてSYNCRIPに対する抗体（抗SYNCRIP-N抗体）を精製した。

【 0 0 8 4 】

② 抗SYNCRIP-Pep抗体

SYNCRIPの140～152番目のアミノ酸を有するペプチドに対する抗体は、キーホールリンペットヘモシアニンでクロスリンクさせた上記ペプチド（なお、ペプチドのN末端にCys残基を人工的に導入した）を用いてウサギから作製した。抗ペプチド抗体（抗SYNCRIP-Pep抗体）は、抗原ペプチド結合ビーズを用いてアフィニティー精製した。

【 0 0 8 5 】

これらの抗体はSYNCRIPと反応し、hnRNP R（82kDa）及びその分解物（74kDa）にも反応した（図8）。また、SYNCRIPの全長cDNAをCOS-7細胞にトランスフェクトするとSYNCRIPは過発現し、抗SYNCRIP-N抗体及び抗SYNCRIP-Pep抗体とともに細胞質に局在した（図3A及びB）。図3A及び3Bにより、SYNCRIPは核には局在せず細胞質に局在することが示された。なお、図3において、Aは、染色した抗SYNCRIP

P-N抗体を用いて間接的免疫蛍光法を行い、COS-7細胞内に過発現したSYNCRIPの挙動を示したときの写真であり、Bは、染色した抗SYNCRIP-Pep抗体を用いて間接的免疫蛍光法を行い、COS-7細胞内に過発現したSYNCRIPの挙動を示したときの写真である。

【0086】

さらに、SYNCRIPを過発現させたCOS-7細胞において、粗核分画、細胞質ゾル分画、粗ミクロソーム分画及び粗シナプス小胞分画に分離し、各分画におけるSYNCRIPの局在性を検証した。結果を図4に示す。

【0087】

なお、図4の各レーンにおいて、P1はマウス小脳の粗核分画、S3は核分画をしたときの上清（細胞質ゾル）、P3は小胞体を含む粗ミクロソーム分画、P2'は粗シナプトソーム分画である。また、LP1は、シナプトソームを低張液に溶解し、そこから得られるシナプス重膜分画であり、LP2は、シナプス小胞分画であり、L S2は、シナプス細胞質ゾル分画であり、PSDは、LP1の分画から調製されたシナプス後部密度分画である。さらに、図4中、IP3R I型のバンドは、イノシトール1,4,5トリフォスフェート受容体1型を示しており、粗ミクロソーム分画のマーカーとなる。さらにまた、PSD95のバンドは、シナプス後部密度タンパク質を示しており、シナプス後部密度分画のマーカーとなる。

【0088】

図4から分かるように、SYNCRIPはミクロソーム分画（P3）においてバンドが現れたのに対し、hnRNP Rはミクロソーム分画においてバンドが現れず、核分画（P1）にバンドが現れたことから、両者は機能、挙動が異なるものであることが示された。

【0089】

(2) SYNCRIPの発現時期及び発現組織

SYNCRIPの発現時期を、生後0日、3日、7日、12日、15日及び21日のマウスと成マウスとからそれぞれ小脳懸濁液を調製し、抗SYNCRIP-N抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。また、各小脳懸濁液中に含まれるSyn-Iの発現についても確認した。結果を図5に示す。なお、図5において、上段のパ

ネルに示すバンドがSYNCRIPを示し、下段のパネルに示すバンドがSyn-Iを示している。

【 0 0 9 0 】

図 5 から分かるように、発育段階のマウス小脳において、SYNCRIPタンパク質発現はP7（生後 7 日）において最も高く、その後減少した（図5、上段）。これに対し、SytIの発現は、発育の間増加した（図5、下段）。

【 0 0 9 1 】

次に、SYNCRIPの発現組織を、生後 7 日のマウスにおける各組織の懸濁液 30 μ g を調製し、抗SYNCRIP-Pep抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。また、各組織におけるhnRNP Rの発現についても確認した。結果を図 6 に示す。なお、図 6 に示す2つの矢印において、上の矢印の位置に出現するバンドはhnRNP R（82kDa）を示し、下の矢印の位置に出現するバンドはSYNCRIPタンパク質（66kDa）を示す。

【 0 0 9 2 】

図 6 から分かるように、SYNCRIPタンパク質（66kDa）は、中枢神経組織のみならず試験した全ての末梢組織においてほとんど一定のレベルで発現した（図6、下の矢印）。なお、82kDaのhnRNP Rは、種々組織においてSYNCRIPと同様に発現した（図6、上の矢印）。

【 0 0 9 3 】

〔実施例3〕 RNAとの結合試験

本発明のタンパク質がRNA分子とを結合するか否かを試験するため、in vitro のRNA結合アッセイを行った。

TNT結合網状赤血球溶解物システム(Promega社)を用いたin vitro翻訳により、 $[^{35}\text{S}]$ で標識したSYNCRIPを作製した。 $[^{35}\text{S}]$ 標識SYNCRIPの各アリコートを、50 μ l の結合バッファー(10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA, 10mM NaCl)中、所定量のpoly RNA又は酵母(yeast) tRNAとともに25℃で30分インキュベートした。50 μ l のpoly (U) Sephadex（結合バッファー中20%スラリー）を各混合物中に添加し、続いて25℃で45分インキュベートした。500 μ l の結合バッファーでビーズを4回洗浄した後、結合画分を10%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、オー

トラジオグラフィーによって解析した。

【 0 0 9 4 】

その結果、図7に示すとおり、 $[^{35}\text{S}]$ 標識SYNCRIPは、poly(U)RNA Sephadexに結合した。図7において、poly(A)の量を含まないとき (poly(A)量 : 0) はバンドが濃く見えるのに対し、poly(A)の量を増加させると (poly(A)量 : 10及び50 μg)、その増加に伴って、標識されたSYNCRIPと支持体上のpoly(U)との結合が阻害され、SYNCRIPが遊離してpoly(A)と結合するためバンドが薄くなる (図7、「poly(A)」のレーン)。一方、酵母tRNA及びpoly(C)RNAはバンドの濃さに変化は認められず、SYNCRIPはpoly(U)との競合をしなかった。従って、本発明のタンパク質SYNCRIPはpoly(A)RNAと優先的に結合することが示された。

【 0 0 9 5 】

〔実施例4〕 SYNCRIPとC2Bドメインとのin vitro結合試験

本実施例は、SYNCRIPのどの領域がシナプトタグミンのC2Bドメインと結合するかについてin vitroで試験を行ったものである。

(1) COS-7で発現させた全長SYNCRIP又は末端切断型SYNCRIPとGST-Syt-II C2Bとの結合

SYNCRIPのN末端側切断型 (ΔN , 全長アミノ酸配列 (配列番号4) の第1～98番目のアミノ酸欠失型)、及びC末端側切断型 (ΔC , 全長アミノ酸配列 (配列番号4) の第401～561番目のアミノ酸欠失型) をコードする各cDNA (図1B) を、実施例2と同様の手法でCOS-7細胞にトランスフェクトした。本実施例では、得られた各COS-7細胞と実施例2で調製したCOS-7細胞とを用いて、全長SYNCRIP又は末端切断型SYNCRIPとGST-Syt-II C2Bとの結合を評価した。

先ず、各SYNCRIPを発現するCOS-7細胞から以下の組成の細胞溶解バッファーを用いて懸濁し、細胞溶解物を調製した。続いて12,000rpm、4℃で20分遠心した。

【 0 0 9 6 】

細胞溶解バッファー : 10mM Hepes-NaOH (pH7.4), 100mM NaCl, 1mM β -メルカプトエタノール, 1mM EDTA, 1% NP-40, 0.2mM PMSF, 10 μM ロイペプチン, 10 μM ペプスタチンA

各溶解物を等量のGST-Syt-II C2Bタンパク質とともに4℃で2時間インキュベ

トした。GST-Syt-II C2Bタンパク質とSYNCRIPとが結合した画分をグルタチオン-Sepharoseで回収し、抗SYNCRIP-Pep抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。なお、ウエスタンブロッティング用抗体の作製は、実施例2で作製したものをを用いた（以下同様）。

【 0 0 9 7 】

(2) マウス脳由来の内因性SYNCRIPとSyt-IIの各種GST-融合体との結合、並びにこれらの結合に対する Ca^{2+} 及び Mg^{2+} の影響

界面活性剤処理によるマウス全脳抽出物(2.5mg/ml)を、以下の組成の溶解バッファー中に調製した。

溶解バッファー：10mM Hepes-NaOH(pH7.4), 140mM NaCl, 1%(w/v) Triton X-100, 1mM β -メルカプトエタノール, 1mM EDTA, 0.2mM PMSF, 10 μ M ロイペプチン, 10 μ M ペプスタチンA

【 0 0 9 8 】

各3mlのアリコートにEGTA(終濃度2mM)、 CaCl_2 (1mM)、EDTA(2mM)又は MgCl_2 (1mM)を添加し、Syt-IIの各種領域を含有するGST-融合タンパク質精製品25 μ g又はGSTのみの精製品25 μ gを加えて4℃で2時間インキュベートした。50 μ l (50%スラリー)のグルタチオン-Sepharoseを添加した後さらに1時間インキュベートし、キレート剤又は二価イオンを含む抽出バッファーで十分洗浄し、結合したタンパク質をウエスタンブロッティングにかけ、SYNCRIPと抗SYNCRIP-N抗体との結合を試験した。

【 0 0 9 9 】

(3) Sf9細胞で発現させた全長SYNCRIPと種々SytのGST-C2Bとの結合

全長SYNCRIPを昆虫細胞Sf9で発現させるため、全長SYNCRIP cDNAをpFASTBAC1(Life Technology社)にサブクローニングし、SYNCRIPを保有する組換えバキュロウイルスを作製し、続いて使用説明書に従い増幅した。10%ウシ胎児血清を補ったTNM-FH培地中で培養したSf9細胞に、増幅した組換えウイルスを感染させた。感染48時間後、結合実験に用いた。

【 0 1 0 0 】

Sf9細胞で発現させた全長SYNCRIPを、(1)に記載の方法と同様にしてSf9細胞か

ら調製した。各アリコートを各種SytのGST-C2B (10~20 μ g) とともにインキュベートした。結合したタンパク質を回収し、ウエスタンブロッティングにより各Sytが結合したSYNCRIPと抗SYNCRIP-N抗体との結合を試験した。

【 0 1 0 1 】

(4) C末端にHis6-タグを付した精製SYNCRIPと、Syt-IIの各C2ドメインを保有する精製GST-融合タンパク質との結合

SYNCRIPのC末端領域 (アミノ酸領域401-561 ; His6-タグを付したもの) を含有する組換えタンパク質を、pRSETプラスミド (Invitrogen) を用いて大腸菌内で発現させた。変性溶液 (6M グアニジン-HCl, 10mM Tris-HCl(pH8.0), 0.5M NaCl, 1mM β -メルカプトエタノール) を用いて封入体から組換えタンパク質を回収し、ProBond樹脂で精製した。6Mから0.001Mまで尿素濃度を徐々に低下させながら、10mM Tris-HCl(pH8.0)、10mM β -メルカプトエタノール、0.1M NaCl、1mM EDTAに対する透析により、変性組換えタンパク質を再生させた。透析物を12,000rpm、4℃で20分遠心し、タンパク質が正しく3次元構造をとらなかった部分及び不溶性部分を除去した。アリコートを各種GST-融合タンパク質とともにインキュベートした後、結合タンパク質を取り出し、抗Xpress抗体 (Invitrogen) を用いたウエスタンブロッティングにかけた。

【 0 1 0 2 】

(5) 共免疫沈降実験

N末端のT7-エピトープでタグを付した各SytをCOS細胞に一過性にトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞を回収して懸濁バッファー (10mM Hepes-NaOH(pH7.4), 100mM NaCl, 0.5mM β -メルカプトエタノール, 1mM EDTA, 1% NP-40, 0.2mM PMSF, 10 μ Mロイペプチン, 10 μ Mペプスタチン) 中に懸濁した。12,000rpmで20分遠心して細胞溶解物を調製した後、アフィニティ精製により得た抗SYNCRIP-N抗体とともにインキュベートし (3.5 μ g抗体/1 ml溶解物、2時間、4℃)、続いて10 μ l (50%スラリー) のプロテインG-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech社) を用いて4℃で1時間インキュベートした。ビーズを懸濁バッファーで5回洗浄した後、SYNCRIP及びT7-タグSytについてウエスタンブロッティングを行うため免疫沈降を行った。

【 0 1 0 3 】

(6)結果

① SYNCRIPはGST-Syt-II C2B及びGST-Syt-II C2ABに同レベルで結合した（図9）。しかし、GST-Syt-II C2A及びGSTのみには結合しなかった。このことは、本発明のタンパク質はシナプトタグミンのC2Bドメインに結合することを意味する。さらに、上記結合は Ca^{2+} 及び Mg^{2+} に依存的であった。なお、生理的濃度に近い1mMの MgCl_2 存在下において明らかな結合が認められたため、*in vivo*においても*in vitro*と同様の結合が行われると考えられる。

【 0 1 0 4 】

② 全長（野生型：W）、N末端側切断型（ Δ N）又はC末端側切断型（ Δ C）SYNCRIPは、それぞれの構築物が予定された分子量のタンパク質に発現されたものであることが確認された（図8、各レーン1の*印）。一方、各SYNCRIPとGST-SytII-C2Bとの結合については、野生型及び Δ N型SYNCRIPは、*印を付したバンドの位置に対応する位置にバンドが現れたことからGST-SytII-C2Bと結合するのに対し、 Δ C型SYNCRIPは*印に対応する位置にバンドが現れないことからGST-SytII-C2Bと結合しない（図8、各レーン2）。なお、 Δ CとSYNCRIPとを長時間反応させても結果に変化はなかった。

【 0 1 0 5 】

③ 前記(3)で調製したSYNCRIPのC末端側領域は、特異的にGST-SytII-C2Bと結合したが、GST-SytII-C2A及びGST単独のものには結合しなかった（図10）。これらの結果は、SYNCRIPのC末端側の161個のアミノ酸領域401-561、すなわち配列番号2に示されるアミノ酸配列領域（配列番号1に示す塩基配列によりコードされる）が、SytのC2Bドメインと直接結合することを示している。

【 0 1 0 6 】

【実施例5】 SYNCRIPとC2Bドメインとの*in vivo*結合試験

本実施例では、SYNCRIPとSytとが*in vivo*で結合するかを調べるため、SYNCRIPの発現が最大となる生後7日目のマウス小脳について、免疫組織化学試験を行った。

【 0 1 0 7 】

トランスフェクト48時間後のCOS-7細胞をPBSで2回洗浄し、PBS中4%のパラホルムアルデヒドにより、室温で20分固定した。固定した細胞をPBS中0.1%のTriton X-100で5分処理した後、速やかにPBSで3回洗浄して細胞に透過性を付与した。PBS中2%の通常ヤギ血清でブロックした後、ブロッキングバッファー中、抗SYNCRIP-N抗体 ($0.27 \mu\text{g/ml}$) 又は抗SYNCRIP-Pep抗体 ($0.55 \mu\text{g/ml}$) とともに細胞をインキュベートした (室温、1時間)。PBSで5回洗浄した後、細胞をFITC-結合ヤギ抗ウサギIgG (Vector, Burlingame, CA) とともにインキュベートした。生後7日目のICRマウスから脳組織を採取し、PBS(-)中4%のパラホルムアルデヒドで灌流した後、切除した脳を同じ固定液に2時間浸し、凍結切断した (厚さ $8 \mu\text{m}$)。各切片を乾燥させた後PBSに再度浸し、免疫反応を行った。免疫蛍光は、Zeiss Axio phot エピ蛍光顕微鏡で観察した。SYNCRIP免疫反応の特異性は、過剰量の抗原ポリペプチドで予めインキュベートした免疫血清又は抗SYNCRIP抗体を用いた並行実験により確認した。

【0108】

その結果、SYNCRIPはほとんどのニューロン、すなわち外胚層及び内部顆粒層並びにプルキンエ細胞の両方において発現した (図11)。生化学的分画試験では、シナプス小胞に富むLP2画分において形態学的に有意なSYNCRIPの量が観察された。しかし、プルキンエ細胞の樹状突起及びシナプス構造が集中する場所並びにSytIシグナルが高度に陽性である場所では、抗SYNCRIP-N抗体反応性シグナルは、これら細胞の核の周囲及び体細胞領域に集中しており、移動した顆粒細胞のない分子層はその中にはほとんど存在しなかった (図11A中、MLの領域)。

【0109】

抗SYNCRIP-Pep抗体を用いた並行実験では、免疫応答シグナルが核において過度に現れた。このことは、抗SYNCRIP-N抗体を用いた核周辺及び体細胞の免疫シグナルが、実際にはニューロンのSYNCRIP局在を示しており、分画試験によるLP2画分において検出されたSYNCRIPシグナルは、シナプス小胞よりは他の膜構造上のSYNCRIPに由来することを示すものである。

【0110】

〔実施例6〕 各種SytとSYNCRIPとの反応試験

SYNCRIPが神経発達の各過程で発現すること、及び種々の組織の至る所で(ubiquitous)発現することから、SYNCRIPの標的は、主要SytであるSyt-I及びSyt-IIのほか、他のSytにも存在することが考えられる。そこで、本発明者は、11種類のSytとSYNCRIPとの結合試験を行った。

【0 1 1 1】

SYNCRIPをSf9細胞で発現させ（実施例4(3)参照）、細胞溶解物を調製した後、各アリコートをほぼ等量のGST-Syt-C2Bとともにインキュベートした。GST-Syt-C2BとSYNCRIPとの結合は、抗-SYNCRIP-N抗体を用いた免疫沈降により検出した。

その結果、SYNCRIPはSyt-I及び-IIのほか、Syt-III、-IV、-VII、-VIII、-IX及び-XIのC2Bドメインと結合することが示された（図12）。

【0 1 1 2】

〔実施例7〕 細胞中のSyt-VII、-VIII及び-IXとSYNCRIPとの反応試験

SYNCRIPが組織の至る所に分布することの知見（図6）を得たことから、Sytのイソフォームが、SYNCRIPの標的として生理的に細胞の至る所に遍在(ubiquitous)するものであるか否かを調べるため、本発明者は、免疫沈降により細胞中の遍在型SytとSYNCRIPとの相互作用を試験した。

【0 1 1 3】

T7-エピトープをタグとして付した全長のSyt-IV、-V、-VII、-VIII及び-IXをCOS-7細胞で一過性に発現させた。COS-7細胞から細胞溶解物を調製し、抗T7抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、抗T7抗体を用いた免疫沈降により、T7タグを付した各Syt（Syt-IV、-VII、-VIII及び-IX）は同程度の発現レベルが認められた（図13上段）。また、免疫沈降物を抗SYNCRIP-N抗体（図13中段）又は抗T7抗体（図13下段）を用いてさらに免疫沈降した結果、SYNCRIPは定常的に発現していることが認められ（図13中段）、さらに、Syt-VII、-VIII及び-IXはT7と特異的に共免疫沈降した（図13下段）。

従って、生理的条件下ではSytの遍在型イソフォームであるSyt-VII、-VIII及び-IXがSYNCRIPの標的であることが示された。

【0 1 1 4】

【発明の効果】

本発明により、RNA結合タンパク質が提供される。本発明のタンパク質は、シナプス小胞上のシナプトタグミンに結合することができるため、神経伝達の調節物質として有用である。

【0 1 1 5】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

MIKOSHIBA KATSUHIKO

<120> RNA-binding protein

<130> RJH12-065N

<140>

<141>

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 483

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(483)

<400> 1

att gaa att gtt ttt gct aag cca cca gat cag aag agg aaa gaa aga 48
Ile Glu Ile Val Phe Ala Lys Pro Pro Asp Gln Lys Arg Lys Glu Arg
1 5 10 15

aaa gct cag agg caa gca gca aag aat caa atg tat gat gat tac tac 96
Lys Ala Gln Arg Gln Ala Ala Lys Asn Gln Met Tyr Asp Asp Tyr Tyr
20 25 30

tat tat ggt cca cct cat atg cct ccc cca aca aga ggt cga ggg cgt 144
Tyr Tyr Gly Pro Pro His Met Pro Pro Pro Thr Arg Gly Arg Gly Arg
35 40 45

gga ggt aga ggt ggc tat gga tat cct cca gat tat tat gga tac gaa 192
Gly Gly Arg Gly Gly Tyr Gly Tyr Pro Pro Asp Tyr Tyr Gly Tyr Glu
50 55 60

gat tat tat gat tat tat ggt tat gat tac cat aac tat cgt ggt gga 240
Asp Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Gly Tyr Asp Tyr His Asn Tyr Arg Gly Gly
65 70 75 80

tat gaa gat cca tac tat ggt tat gaa gat ttt caa gtt gga gct aga 288
Tyr Glu Asp Pro Tyr Tyr Gly Tyr Glu Asp Phe Gln Val Gly Ala Arg
85 90 95

gga agg ggt ggt aga gga gca agg ggt gct gct cca tcc aga ggt cgt 336
Gly Arg Gly Gly Arg Gly Ala Arg Gly Ala Ala Pro Ser Arg Gly Arg

100

105

110

ggg gct gct cct ccc cgt ggt aga gcc ggt tat tca cag aga gga ggc 384

Gly Ala Ala Pro Pro Arg Gly Arg Ala Gly Tyr Ser Gln Arg Gly Gly

115

120

125

cct gga tca gca aga ggc gtt cgc ggt gcg aga gga ggt gcc caa caa 432

Pro Gly Ser Ala Arg Gly Val Arg Gly Ala Arg Gly Gly Ala Gln Gln

130

135

140

caa aga ggc cgc ggg gga aaa ggg gtc gag gcc ggt cct gac ctg tta 480

Gln Arg Gly Arg Gly Gly Lys Gly Val Glu Ala Gly Pro Asp Leu Leu

145

150

155

160

caa

483

Gln

<210> 2

<211> 161

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Ile Glu Ile Val Phe Ala Lys Pro Pro Asp Gln Lys Arg Lys Glu Arg

1

5

10

15

Lys Ala Gln Arg Gln Ala Ala Lys Asn Gln Met Tyr Asp Asp Tyr Tyr

20

25

30

Tyr Tyr Gly Pro Pro His Met Pro Pro Pro Thr Arg Gly Arg Gly Arg
35 40 45

Gly Gly Arg Gly Gly Tyr Gly Tyr Pro Pro Asp Tyr Tyr Gly Tyr Glu
50 55 60

Asp Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Gly Tyr Asp Tyr His Asn Tyr Arg Gly Gly
65 70 75 80

Tyr Glu Asp Pro Tyr Tyr Gly Tyr Glu Asp Phe Gln Val Gly Ala Arg
85 90 95

Gly Arg Gly Gly Arg Gly Ala Arg Gly Ala Ala Pro Ser Arg Gly Arg
100 105 110

Gly Ala Ala Pro Pro Arg Gly Arg Ala Gly Tyr Ser Gln Arg Gly Gly
115 120 125

Pro Gly Ser Ala Arg Gly Val Arg Gly Ala Arg Gly Gly Ala Gln Gln
130 135 140

Gln Arg Gly Arg Gly Gly Lys Gly Val Glu Ala Gly Pro Asp Leu Leu
145 150 155 160

Gln

<210> 3

<211> 3452

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (154)..(1839)

<400> 3

gcgggtttgc tgccagcggc gtgagcttcg gccgccattt tacaacagct ccactcgcgc 60

cggacacagg gagcagcgag cacgcgttcc ccgccagccg acccggtcgg acggattcct 120

cggccccagc cccgcgggga gatctctgga aac atg gct aca gaa cat gtt aat 174

Met Ala Thr Glu His Val Asn

1

5

gga aat ggt act gaa gag ccc atg gat act act tca gca gtt atc cat 222

Gly Asn Gly Thr Glu Glu Pro Met Asp Thr Thr Ser Ala Val Ile His

10

15

20

tca gaa aat ttt cag aca ttg ctt gat gct ggt tta cca cag aaa gtt 270

Ser Glu Asn Phe Gln Thr Leu Leu Asp Ala Gly Leu Pro Gln Lys Val

25

30

35

gct gaa aaa cta gat gaa att tac gtt gca ggg cta gtt gca cat agt 318

Ala Glu Lys Leu Asp Glu Ile Tyr Val Ala Gly Leu Val Ala His Ser

40

45

50

55

gat tta gat gaa aga gct atc gaa gct tta aaa gag ttc aat gaa gac 366
 Asp Leu Asp Glu Arg Ala Ile Glu Ala Leu Lys Glu Phe Asn Glu Asp

60

65

70

ggc gca ttg gca gtg ctt caa cag ttt aaa gac agt gat ctc tct cat 414
 Gly Ala Leu Ala Val Leu Gln Gln Phe Lys Asp Ser Asp Leu Ser His

75

80

85

gtt cag aac aaa agt gcc ttt tta tgt gga gtc atg aag act tac agg 462
 Val Gln Asn Lys Ser Ala Phe Leu Cys Gly Val Met Lys Thr Tyr Arg

90

95

100

cag aga gaa aaa cag ggg acc aaa gta gca gac tct agt aaa gga cca 510
 Gln Arg Glu Lys Gln Gly Thr Lys Val Ala Asp Ser Ser Lys Gly Pro

105

110

115

gat gag gca aag att aag gca ctt ttg gaa aga aca ggc tac aca ctt 558
 Asp Glu Ala Lys Ile Lys Ala Leu Leu Glu Arg Thr Gly Tyr Thr Leu

120

125

130

135

gat gtg act aca ggt cag agg aag tat gga gga cca cct cca gat tcc 606
 Asp Val Thr Thr Gly Gln Arg Lys Tyr Gly Gly Pro Pro Pro Asp Ser

140

145

150

gtt tat tca ggt cag cag cct tct gtt ggc act gag ata ttt gtg ggg 654
 Val Tyr Ser Gly Gln Gln Pro Ser Val Gly Thr Glu Ile Phe Val Gly

155

160

165

aag atc ccc aga gat ctg ttt gag gat gag ctt gtt cca tta ttt gag 702

Lys Ile Pro Arg Asp Leu Phe Glu Asp Glu Leu Val Pro Leu Phe Glu

170

175

180

aaa gct gga cct ata tgg gat ctt cgt tta atg atg gat ccg ctc act 750

Lys Ala Gly Pro Ile Trp Asp Leu Arg Leu Met Met Asp Pro Leu Thr

185

190

195

ggt ctc aac aga ggt tat gcg ttt gtc act ttt tgt aca aaa gaa gca 798

Gly Leu Asn Arg Gly Tyr Ala Phe Val Thr Phe Cys Thr Lys Glu Ala

200

205

210

215

gca caa gag gct gtt aaa ctg tat aat aat cat gaa att cgt tcc ggg 846

Ala Gln Glu Ala Val Lys Leu Tyr Asn Asn His Glu Ile Arg Ser Gly

220

225

230

aag cac att ggt gtc tgc atc tca gtt gcc aac aat agg ctt ttt gtg 894

Lys His Ile Gly Val Cys Ile Ser Val Ala Asn Asn Arg Leu Phe Val

235

240

245

ggc tcg att cct aag agt aaa acc aag gag cag att ctt gag gaa ttt 942

Gly Ser Ile Pro Lys Ser Lys Thr Lys Glu Gln Ile Leu Glu Glu Phe

250

255

260

agc aaa gtg aca gag ggt ctc aca gat gtc att tta tac cac caa cct 990

Ser Lys Val Thr Glu Gly Leu Thr Asp Val Ile Leu Tyr His Gln Pro

265

270

275

gat gac aag aaa aaa aac aga ggc ttt tgc ttt ctt gaa tat gaa gat 1038

Asp Asp Lys Lys Lys Asn Arg Gly Phe Cys Phe Leu Glu Tyr Glu Asp

280	285	290	295	
cac aaa aca gct gcc cag gca aga cgt agg cta atg agt ggt aaa gtc				1086
His Lys Thr Ala Ala Gln Ala Arg Arg Arg Leu Met Ser Gly Lys Val				
	300	305	310	
aaa gtc tgg gga aat gtt gga act gtt gag tgg gct gat cct att gaa				1134
Lys Val Trp Gly Asn Val Gly Thr Val Glu Trp Ala Asp Pro Ile Glu				
	315	320	325	
gat cct gat cct gaa gtt atg gca aag gta aaa gtg ctg ttt gta cgc				1182
Asp Pro Asp Pro Glu Val Met Ala Lys Val Lys Val Leu Phe Val Arg				
	330	335	340	
aac ctt gcc aac acg gta aca gaa gaa att tta gaa aag tca ttt agt				1230
Asn Leu Ala Asn Thr Val Thr Glu Glu Ile Leu Glu Lys Ser Phe Ser				
	345	350	355	
cag ttt ggg aaa ctg gaa cga gta aag aag cta aaa gat tat gct ttc				1278
Gln Phe Gly Lys Leu Glu Arg Val Lys Lys Leu Lys Asp Tyr Ala Phe				
360	365	370	375	
att cat ttt gat gag aga gat ggt gct gtc aag gct atg gaa gaa atg				1326
Ile His Phe Asp Glu Arg Asp Gly Ala Val Lys Ala Met Glu Glu Met				
	380	385	390	
aat ggt aaa gac ttg gag gga gaa aat att gaa att gtt ttt gct aag				1374
Asn Gly Lys Asp Leu Glu Gly Glu Asn Ile Glu Ile Val Phe Ala Lys				
	395	400	405	

cca cca gat cag aag agg aaa gaa aga aaa gct cag agg caa gca gca 1422
Pro Pro Asp Gln Lys Arg Lys Glu Arg Lys Ala Gln Arg Gln Ala Ala

410

415

420

aag aat caa atg tat gat gat tac tac tat tat ggt cca cct cat atg 1470
Lys Asn Gln Met Tyr Asp Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Pro His Met

425

430

435

cct ccc cca aca aga ggt cga ggg cgt gga ggt aga ggt ggc tat gga 1518
Pro Pro Pro Thr Arg Gly Arg Gly Arg Gly Gly Arg Gly Gly Tyr Gly

440

445

450

455

tat cct cca gat tat tat gga tac gaa gat tat tat gat tat tat ggt 1566
Tyr Pro Pro Asp Tyr Tyr Gly Tyr Glu Asp Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Gly

460

465

470

tat gat tac cat aac tat cgt ggt gga tat gaa gat cca tac tat ggt 1614
Tyr Asp Tyr His Asn Tyr Arg Gly Gly Tyr Glu Asp Pro Tyr Tyr Gly

475

480

485

tat gaa gat ttt caa gtt gga gct aga gga agg ggt ggt aga gga gca 1662
Tyr Glu Asp Phe Gln Val Gly Ala Arg Gly Arg Gly Gly Arg Gly Ala

490

495

500

agg ggt gct gct cca tcc aga ggt cgt ggg gct gct cct ccc cgt ggt 1710
Arg Gly Ala Ala Pro Ser Arg Gly Arg Gly Ala Ala Pro Pro Arg Gly

505

510

515

aga gcc ggt tat tca cag aga gga ggc cct gga tca gca aga ggc gtt 1758

Arg Ala Gly Tyr Ser Gln Arg Gly Gly Pro Gly Ser Ala Arg Gly Val

520

525

530

535

cgc ggt gcg aga gga ggt gcc caa caa caa aga ggc cgc ggg gga aaa 1806

Arg Gly Ala Arg Gly Gly Ala Gln Gln Gln Arg Gly Arg Gly Gly Lys

540

545

550

ggg gtc gag gcc ggt cct gac ctg tta caa tga agactgactt gctattgtgg 1859

Gly Val Glu Ala Gly Pro Asp Leu Leu Gln

555

560

gattacacca gaagcttgca gtggagtaat ggtaaggaaa atcaagcaac cttaaataac 1919

tcggatgtat aggagcatat tctattgcag aagaccctcc tatgaagatc atggaatcaa 1979

atacgggaca ttgaactaat acttggactt tggtatgaat ttctttaaca attttctctg 2039

cagtgcaggt tattaaacta aagctactct attttccaaa tgtgttccaa aaaaatcctt 2099

cataacttct agcatggtat ctttaataaag aataaagttg ttctctttaa aaaatctgct 2159

ctaagtagat tttcccctc ttttttaatt aaggatctca gcagtgggtat tctgaaatat 2219

tctcttgaat ttgtgcattt aaattttatt gcagtgatac agatgccact gttggtaccc 2279

ttaaattttt atttctgctc accaagggtta atcatgattg tctatatctt ttttatagta 2339

atcacttttg aattgtgttc agatgcagtt tcaggtgtta tcatcagagc tggtagtca 2399

ggcatccag atagtggttc ttttcagaac ctttttaaag ggttggttaa ctacctcagt 2459
 agcagaggat tgaactatac cctgtctgta ctgtacatag aaaatctttg tagataaaag 2519
 caaggcttgt taaatatgat atgagggtaa gattttaata taccaaagt aacattctta 2579
 gttgccttta gtttcagagg cttgtaagac ttcctcatga ccatcataac aggcccttgct 2639
 tttgtcgtat tttgtggctg aaaaagcagc cttgcttctt cagatattgt agttatttgg 2699
 atgtataata gtttagcaag atgttacttt tgtaagacat cagatgttca aaaaaaagt 2759
 gcatccgaac ttgtactaaa tactgcagtg tccctttata aaaagtcaga ctaaaactga 2819
 caattgtaca gcaaagcctg acatttggat attttgaagt tttttcataa atcatagaaa 2879
 ttagtatatg gctgtagttt agcttttttag gtaaaaggta tgtttcatta gtgcatttgt 2939
 tattgctgat cactataaaa atgtgaatca gctttccatt tcttatgcag gtcatgataa 2999
 cttgtagaat agagtacaat catttgtgct atgttttta ttttctaaag caccttgatg 3059
 acaatgagtg ttcagtgggtg aagcatcctc tattgaatca cctcaaaaa attttttgc 3119
 caagtcctaa gttgatagct taaagtcaaa agtaaaatta tagtttaagt aggacttgg 3179
 gtaaagaaac accctcccc tccccaaaag ggatactgca gttctatcac acaccagta 3239

ggcaccacga tgacgatcag agctagacct gactaagggt ttatacacac cagttcccca 3299

gtaaatgcaa atttaacaag aaaattagac atgtcatatg ttcaaaatgc tcatggcaaa 3359

caatcatttt gcattcctgc aaataaaatt gttttatacc agcttggact taaccaggct 3419

gaacttgcta atcggatccc cgggtaccga gct 3452

<210> 4

<211> 561

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Ala Thr Glu His Val Asn Gly Asn Gly Thr Glu Glu Pro Met Asp

1 5 10 15

Thr Thr Ser Ala Val Ile His Ser Glu Asn Phe Gln Thr Leu Leu Asp

20 25 30

Ala Gly Leu Pro Gln Lys Val Ala Glu Lys Leu Asp Glu Ile Tyr Val

35 40 45

Ala Gly Leu Val Ala His Ser Asp Leu Asp Glu Arg Ala Ile Glu Ala

50 55 60

Leu Lys Glu Phe Asn Glu Asp Gly Ala Leu Ala Val Leu Gln Gln Phe

65 70 75 80

Lys Asp Ser Asp Leu Ser His Val Gln Asn Lys Ser Ala Phe Leu Cys

85

90

95

Gly Val Met Lys Thr Tyr Arg Gln Arg Glu Lys Gln Gly Thr Lys Val

100

105

110

Ala Asp Ser Ser Lys Gly Pro Asp Glu Ala Lys Ile Lys Ala Leu Leu

115

120

125

Glu Arg Thr Gly Tyr Thr Leu Asp Val Thr Thr Gly Gln Arg Lys Tyr

130

135

140

Gly Gly Pro Pro Pro Asp Ser Val Tyr Ser Gly Gln Gln Pro Ser Val

145

150

155

160

Gly Thr Glu Ile Phe Val Gly Lys Ile Pro Arg Asp Leu Phe Glu Asp

165

170

175

Glu Leu Val Pro Leu Phe Glu Lys Ala Gly Pro Ile Trp Asp Leu Arg

180

185

190

Leu Met Met Asp Pro Leu Thr Gly Leu Asn Arg Gly Tyr Ala Phe Val

195

200

205

Thr Phe Cys Thr Lys Glu Ala Ala Gln Glu Ala Val Lys Leu Tyr Asn

210

215

220

Asn His Glu Ile Arg Ser Gly Lys His Ile Gly Val Cys Ile Ser Val

225	230	235	240
Ala Asn Asn Arg Leu Phe Val Gly Ser Ile Pro Lys Ser Lys Thr Lys			
	245	250	255
Glu Gln Ile Leu Glu Glu Phe Ser Lys Val Thr Glu Gly Leu Thr Asp			
	260	265	270
Val Ile Leu Tyr His Gln Pro Asp Asp Lys Lys Lys Asn Arg Gly Phe			
	275	280	285
Cys Phe Leu Glu Tyr Glu Asp His Lys Thr Ala Ala Gln Ala Arg Arg			
	290	295	300
Arg Leu Met Ser Gly Lys Val Lys Val Trp Gly Asn Val Gly Thr Val			
305	310	315	320
Glu Trp Ala Asp Pro Ile Glu Asp Pro Asp Pro Glu Val Met Ala Lys			
	325	330	335
Val Lys Val Leu Phe Val Arg Asn Leu Ala Asn Thr Val Thr Glu Glu			
	340	345	350
Ile Leu Glu Lys Ser Phe Ser Gln Phe Gly Lys Leu Glu Arg Val Lys			
	355	360	365
Lys Leu Lys Asp Tyr Ala Phe Ile His Phe Asp Glu Arg Asp Gly Ala			
	370	375	380

Val Lys Ala Met Glu Glu Met Asn Gly Lys Asp Leu Glu Gly Glu Asn
385 390 395 400

Ile Glu Ile Val Phe Ala Lys Pro Pro Asp Gln Lys Arg Lys Glu Arg
405 410 415

Lys Ala Gln Arg Gln Ala Ala Lys Asn Gln Met Tyr Asp Asp Tyr Tyr
420 425 430

Tyr Tyr Gly Pro Pro His Met Pro Pro Pro Thr Arg Gly Arg Gly Arg
435 440 445

Gly Gly Arg Gly Gly Tyr Gly Tyr Pro Pro Asp Tyr Tyr Gly Tyr Glu
450 455 460

Asp Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Gly Tyr Asp Tyr His Asn Tyr Arg Gly Gly
465 470 475 480

Tyr Glu Asp Pro Tyr Tyr Gly Tyr Glu Asp Phe Gln Val Gly Ala Arg
485 490 495

Gly Arg Gly Gly Arg Gly Ala Arg Gly Ala Ala Pro Ser Arg Gly Arg
500 505 510

Gly Ala Ala Pro Pro Arg Gly Arg Ala Gly Tyr Ser Gln Arg Gly Gly
515 520 525

Pro Gly Ser Ala Arg Gly Val Arg Gly Ala Arg Gly Gly Ala Gln Gln
530 535 540

Gln Arg Gly Arg Gly Gly Lys Gly Val Glu Ala Gly Pro Asp Leu Leu
 545 550 555 560

Gln

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Val Thr Glu Gly Leu Thr Asp Val Ile Leu Tyr His Gln Pro Asp Asp
 1 5 10 15

Lys

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Val Thr Glu Gly Leu Thr
 1 5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Tyr His Gln Pro Asp Asp Lys

1

5

<210> 8

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> modified base

<222> 3

<223> n represents a, g, c or t

<220>

<221> modified base

<222> 6

<223> n represents a, g, c or t

<220>

<221> modified base

<222> 12

<223> n represents a, g, c or t

<220>

<221> modified base

<222> 15

<223> n represents a, g, c or t

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 8

gtnacngarg gnytnac

17

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> modified base

<222> 10

<223> n represents a, g, c or t

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 9

yttrtcrctcn ggytgrtgrt a

21

【0116】

【配列表フリーテキスト】

配列番号8：nはa、g、c又はtを表す（存在位置：3）。

配列番号8：nはa、g、c又はtを表す（存在位置：6）。

配列番号8：nはa、g、c又はtを表す（存在位置：12）。

配列番号8：nはa、g、c又はtを表す（存在位置：15）。

配列番号8：合成DNA

配列番号9：nはa、g、c又はtを表す（存在位置：10）。

配列番号9：合成DNA

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明のタンパク質SYNCRIPをコードする各種長さのcDNAクローン(A)、及び末端欠失型SYNCRIP遺伝子の構築法(B)を示す図である。

【図2】

SYNCRIPとhnRNP Rとの間におけるアミノ酸配列の比較を示す図である。

【図3】

SYNCRIPの細胞質局在を示す写真である。

【図4】

各細胞画分中のSYNCRIPの発現を示す写真である。

【図5】

マウスの各成長段階におけるSYNCRIPの発現を示す写真である。

【図6】

マウスの各組織におけるSYNCRIPの発現を示す写真である。

【図7】

SYNCRIPとRNAとの結合試験結果を示す写真である。

【図8】

切断型SYNCRIPに対する抗体（抗 Δ SYNCRIP抗体）の反応性試験結果を示す写真である。

【図9】

SytのC2A及び／又はC2BドメインとSYNCRIPとの結合試験結果を示す写真である。

【図 1 0】

SytのC2A又はC2BドメインとSYNCRIPのC末端側領域との結合試験結果を示す写真である。

【図 1 1】

免疫組織化学染色の試験結果を示す写真である。

【図 1 2】

SYNCRIPとSytの各イソフォームとの結合試験結果を示す写真である。

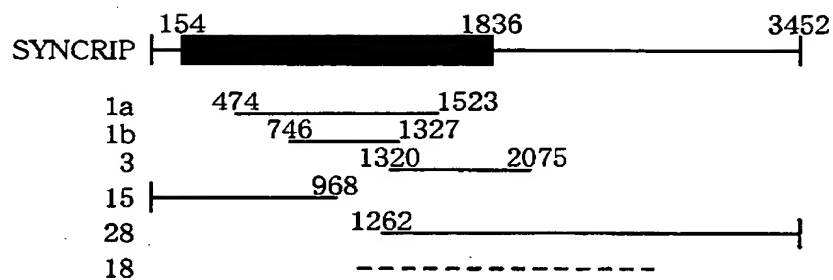
【図 1 3】

SYNCRIPとSytの各イソフォームとの結合試験結果を示す写真である。

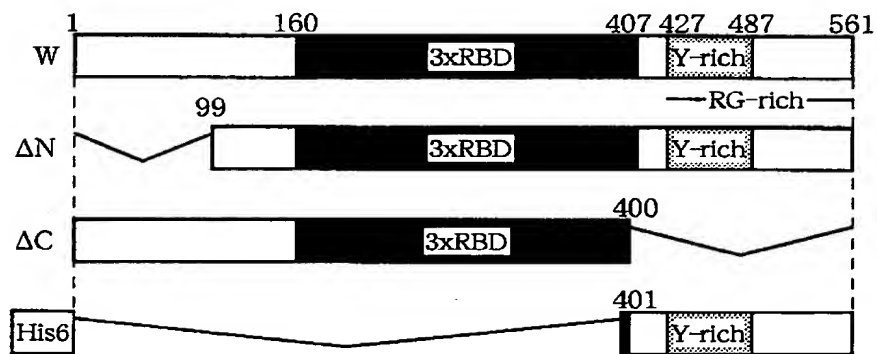
【書類名】 図面

【図 1】

A



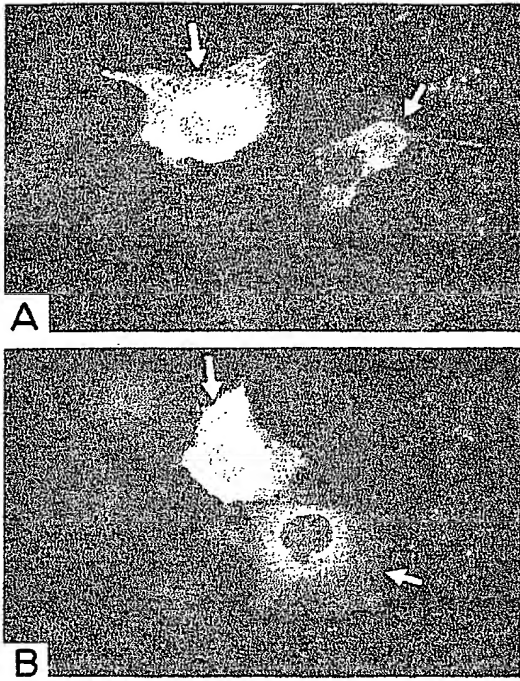
B



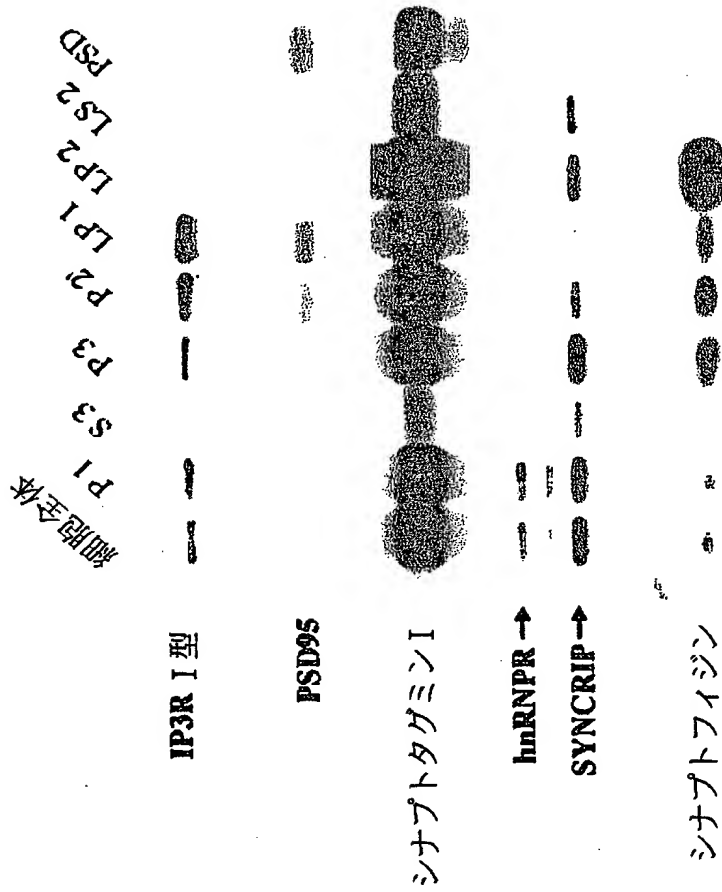
【図2】

SYNCRIP	1:-----MATEBVNGNGTTEPNDTTEAVIESNFQILLDAGLPQKVAEKLDHIVVAGLVARSD	56
hnrNPR	1:MANQVNGNAVQLKEEHEPMD-ESSVTEHYKTHIEAGUEKVAERLDELFQTEAYVD	59
SYNCRIP	57:LDERRATEALKETNEEDGALAVLQOFKDSDLSEVONKSAFLCGVATYRQREKOGTEVADSS	116
hnrNPR	60:LDERRALDALRENEECALSVLQOFKESDLSHVONKSAFLCGVATYRQREKOGSEVQBST	119
SYNCRIP	117:KGPDEAKIKALLERTGYLDTITGORKYGGFPEDSVYSGQFESVGTIFVAGKIERDISED	176
hnrNPR	120:KGPDEAKIKALLERTGYLDTITGORKYGGFPEDSVYSGVREGICTFVYVQKIERDISED	179
SYNCRIP	177:ELVPLEERAGELWDLRLMNDPITGLNRGYATVTFCTERRACHAVRYNNBEIRSGKHIGV	236
hnrNPR	180:ELVPLEERAGELWDLRLMNDPISQNRCTATITFCGKTRACHAVKCDSEIRPCKELGV	239
SYNCRIP	237:CTEVANNRLVGGSTKSKKTKOCHIEFHYVFGCLLOVLTGPPDKKINBGCFLVYED	296
hnrNPR	240:CTEVANNRLVGGSTKSKKTKENLHEVETVTCGLVDVLTGPPDKKINBGCFLVYED	299
clone-18 (m-hnrNPR)	1:-----	2
SYNCRIP	297:KTAQAARRRLHSGKVYVWGNVGVVWADFIEDDPDPMVAVVYVWNLANTVARELNN	356
hnrNPR	300:KSAQAARRRLHSGKVYVWGNVGVVWADVVEEDPEVAVVYVWNLANTVARELNN	359
clone-18 (m-hnrNPR)	3:KSAQAARRRLHSGKVYVWGNVGVVWADVVEEDPEVAVVYVWNLANTVARELNN	62
SYNCRIP	357:SYSQYGLSEVYKKIKDYAKIIEPDRDGGYKAMEBANGKDLGENTMYTAKFEEDOKKAE	416
hnrNPR	360:SESEFGLEKRVKEDDYAVVEEDRGAAYVANDENNGCTIEGEELEVLAKFEEDOKKAE	419
clone-18 (m-hnrNPR)	63:SESEFGLEKRVKEDDYAVVEEDRGAAYVANDENNGCTIEGEELEVLAKFEEDOKKAE	122
SYNCRIP	417:KAQQAAXNQHYDDYTYGEPHHEPETHRGR-GRGGYGYEPEYHREDDY-DYKGYDY	474
hnrNPR	420:QAARQASRSTAYEDYVHEPETHRGRGGGGGGGYEPEYHREDDY-DYKGYDY	479
clone-18 (m-hnrNPR)	123:QAARQASRSTAYEDYVHEPETHRGRGGGGGGGYEPEYHREDDY-DYKGYDY	181
SYNCRIP	475:HNRYGGYNDPYGYED-FQVCARGRGRCARQA-ASGRGCLAPPKGRAGGGRGGE-GS	531
hnrNPR	480:EDYKGGYNDPYGYEDGYAVRGG-GRGGGSGAPP-PRGRGAPPGRAGYHORGAPLGP	538
clone-18 (m-hnrNPR)	182:EDYKGGYNDPYGYEDGYAVRGG-GRGGGSGAPP-PRGRGAPPGRAGYHORGAPLGP	240
SYNCRIP	532:ARQVHGAGCG-AQDVRGRGKGV-FA-GPDLLO-----	561
hnrNPR	539:PRGSRGGRGFPAGQOQGRGSRGSRGNRGGNVGGKRTADGYHORDKERTGNNQONWCAQ	598
clone-18 (m-hnrNPR)	241:PRGSRGGRGFPAGQOQGRGSRGSRGNRGGNVGGKRTADGYHORDKERTGNNQONWCAQ	300
hnrNPR	562:-----	
clone-18 (m-hnrNPR)	599:PAQOPLQGGDYSGHYGYNNDNOHYVQDTYGOQWK	633
	301:PAQOPLQGGDYSGHYGYNNDNOHYVQDTYGOQWK	335

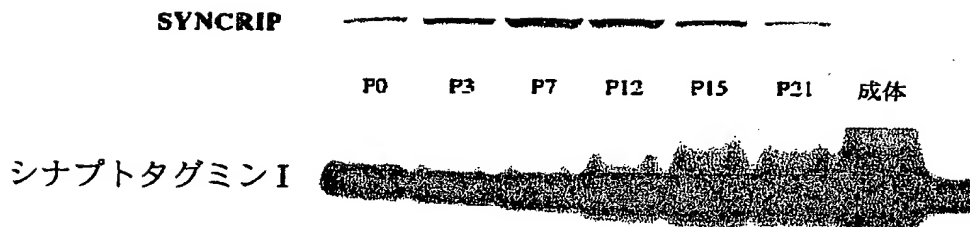
【図 3】



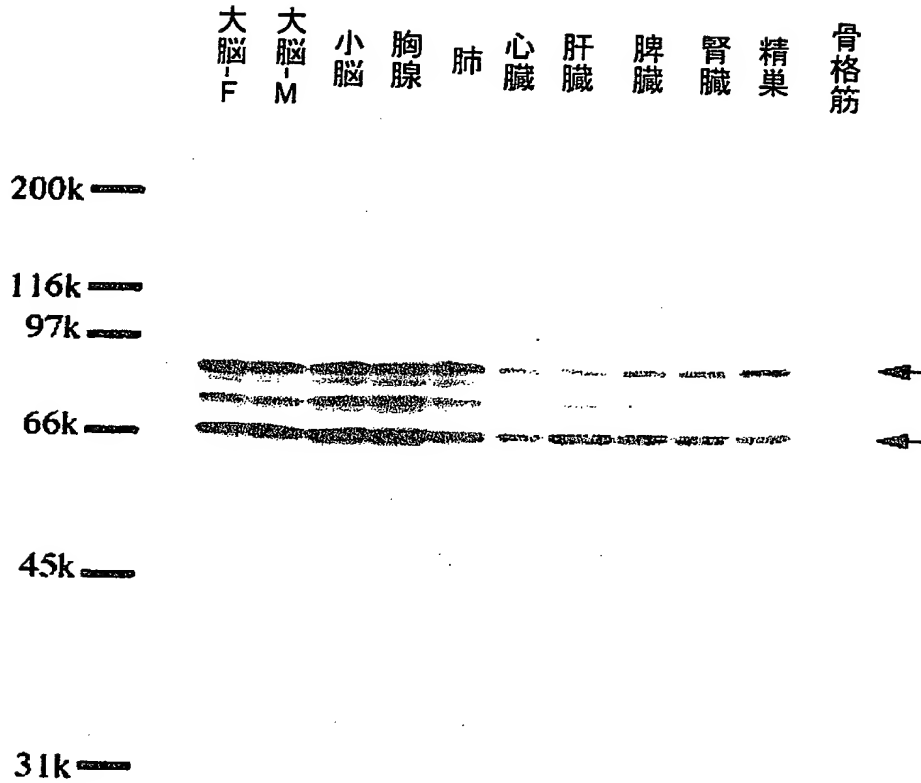
【図 4】



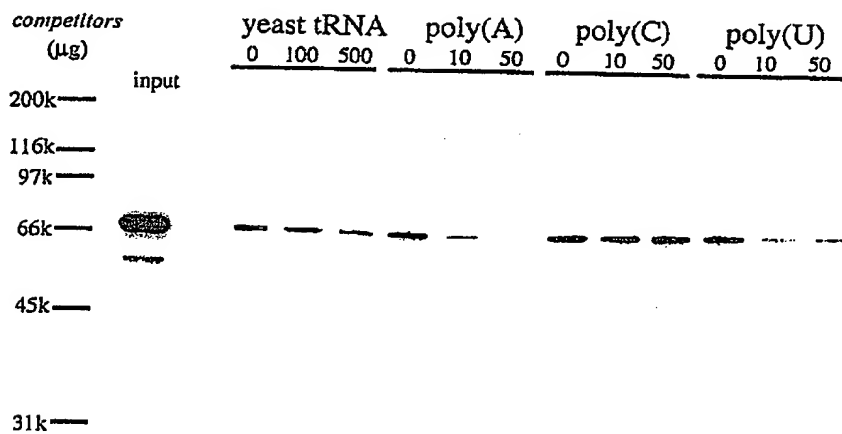
【図 5】



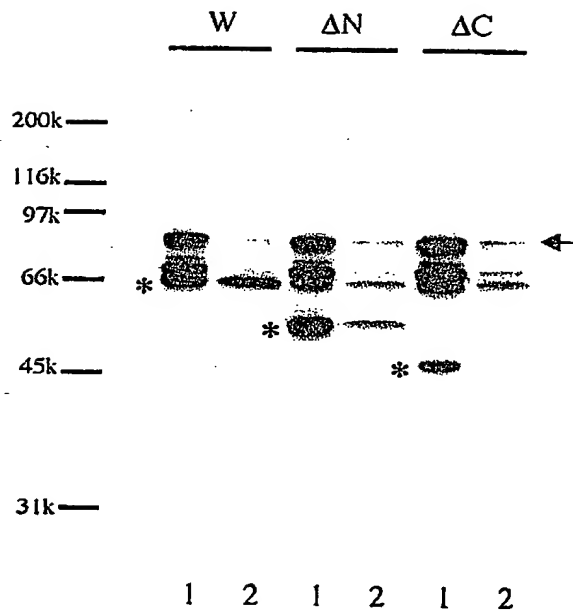
【図 6】



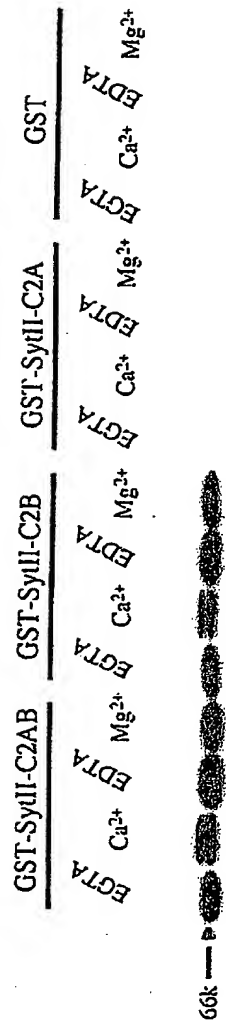
【図 7】



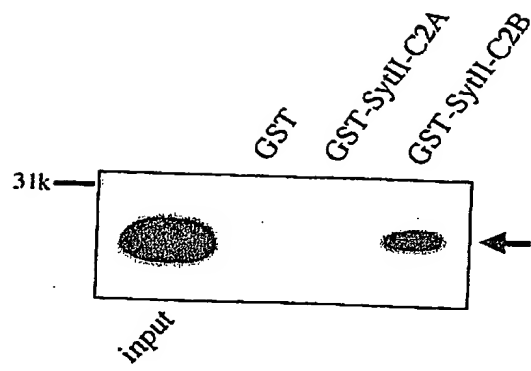
【図 8】



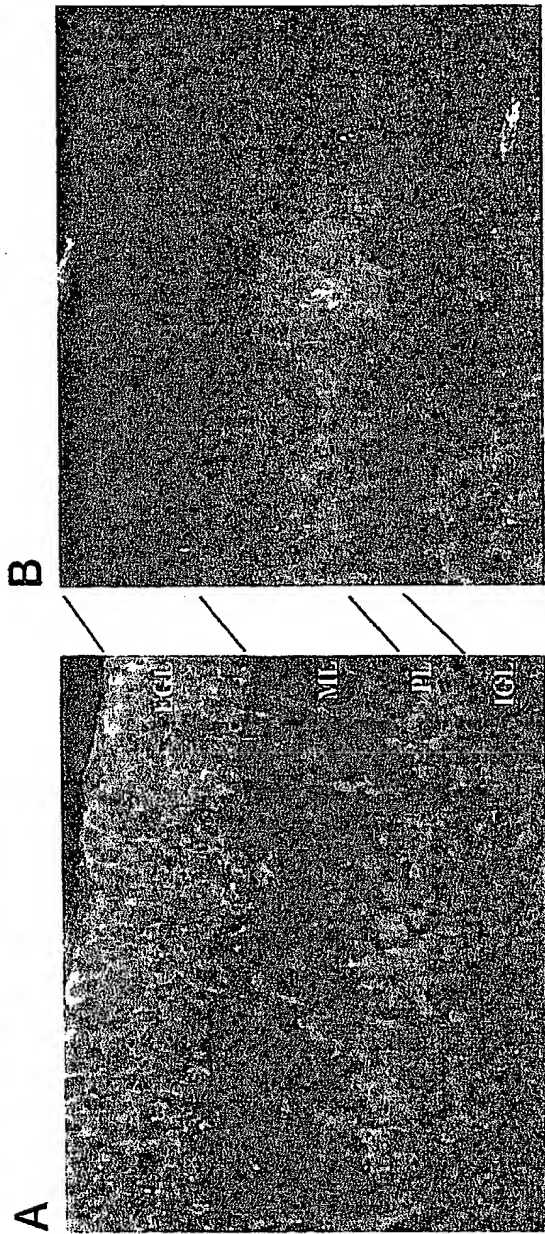
【図 9】



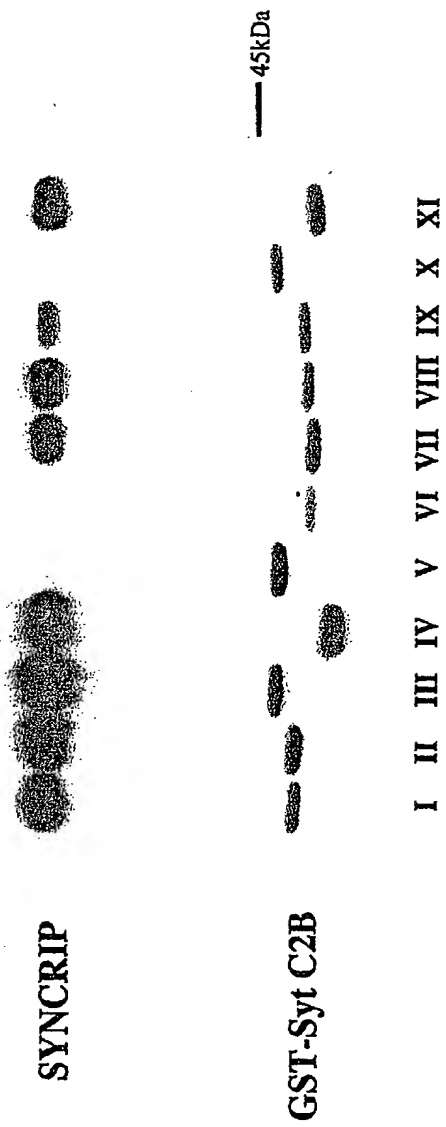
【図 1 0】



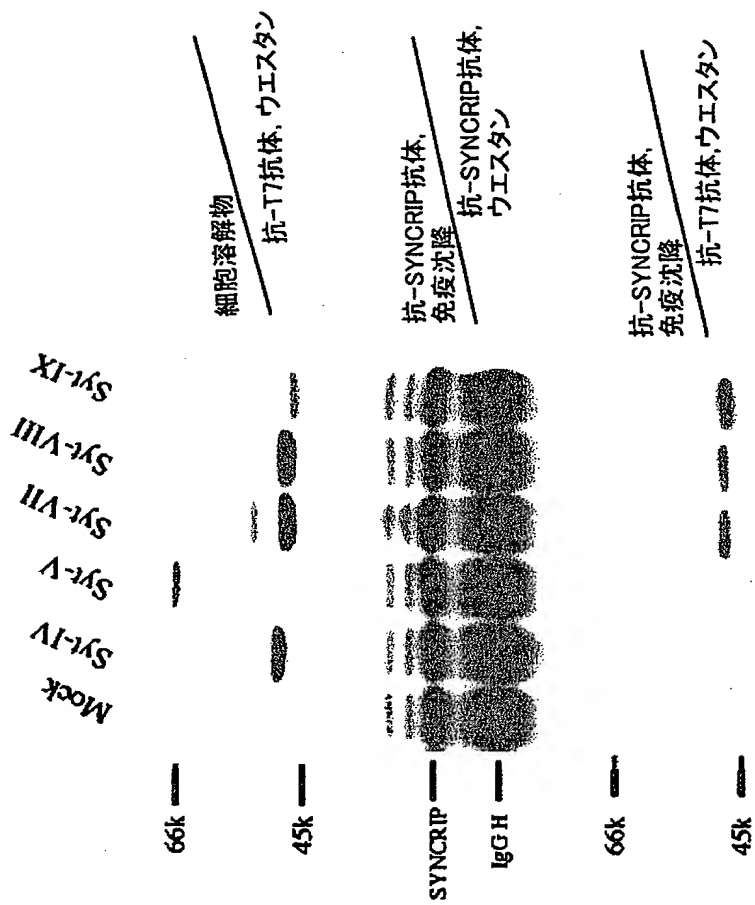
【図 1 1】



【図 1 2】



【図 13】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 シナプトタグミン結合性のRNA結合タンパク質、及び該タンパク質をコードする遺伝子の提供。

【解決手段】 以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質又は該タンパク質をコードする遺伝子。

(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつRNAとの結合活性を有するタンパク質

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006792]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	埼玉県和光市広沢2番1号
氏 名	理化学研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [392017978]

1. 変更年月日 1992年 5月29日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都三鷹市井の頭2-19-25
氏 名 御子柴 克彦